

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

F3

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. November 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/087608 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 38/17**,
A61P 25/06

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04086

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. April 2002 (12.04.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 20 834.0 27. April 2001 (27.04.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG**
[DE/DE]; 55216 Ingelheim/Rhein (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KRESS, Michaela**
[DE/DE]; Hartmannstr. 51, 91054 Erlangen (DE).
HABERBERGER, Rainer [DE/DE]; Bahnhofstr. 15c,
35085 Ebsdorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NOVEL PAIN RELIEVERS WHICH ARE TRP-CHANNEL INHIBITORS

(54) Bezeichnung: NEUE SCHMERZMITTEL, DIE INHIBITOREN VON TRP-KANALEN SIND

(57) Abstract: The invention relates to novel targets for pain relievers and a method for discovering novel pain relievers and the use thereof. The invention particularly relates to the use of inhibitors of channel proteins of the TRP-family, preferably the STRPC sub-family, for treating painful conditions, particularly inflammatory pain.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft neue Targets für Schmerzmittel sowie Verfahren zum Auffinden von neuen Schmerzmitteln und deren Verwendung. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von Inhibitoren von Kanalproteinen der TRP-Familie, bevorzugt der Subfamilie STRPC, zur Behandlung von Schmerzzuständen, insbesondere Entzündungsschmerzen.

WO 02/087608 A1

Neue Schmerzmittel, die Inhibitoren von TRP-Kanälen sind

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Targets für Schmerzmittel sowie Verfahren zum Auffinden von neuen Schmerzmitteln und deren Verwendung.

5 Nozizeptoren sind feine unmyelinisierte oder dünn myelinisierte Nervenfasern mit freien Nervenendigungen, die in fast allen Geweben zu finden sind, und deren Aufgabe die Detektion von potentiell gewebeschädigenden, noxischen Einflüssen aus der Umwelt oder dem Körperinneren ist. Noxische Reize (z.B. mechanische Abscherung oder Hitze) an den rezeptiven Feldern rufen Aktionspotentiale in Nozizeptoren hervor. Ebenso wirken viele Entzündungsmediatoren auf Nozizeptoren exzitatorisch (Kress & Reeh, 1996). Im entzündeten Gewebe reagieren Nozizeptoren häufig mit einer Zunahme der Empfindlichkeit für Hitze-
10 reize (Sensibilisierung), die charakterisiert ist durch eine gesteigerte Entladungsaktivität sowie durch eine Verschiebung der Reizschwelle in den nicht-noxischen Temperaturbereich (Kress & Reeh, 1996). Eine Schlüsselrolle bei der Nozizeptorsensibilisierung spielt die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Guenther et al. 1999; Kress & Guenther, 1999). Solche Veränderungen an nozizeptiven Neuronen werden durch endogene Entzündungsmediatoren wie Bradykinin oder Trypsin hervorgerufen, die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Nozizeptormembran binden (Koltzenburg et al. 1992). Sowohl für Brady-
20 kinin als auch für Trypsin sind Anstiege der intrazellulären Kalziumkonzentration beschrieben worden, die durch die bisher bekannten Signalwege nicht erklärt werden können (Steinhoff et al. 2000; Jiang et al. 1998; Reiser & Hamprecht, 1985). Auch die funktionelle Grundlage für die exzitatorische Wirkung von Bradykinin ist bisher unbekannt. Wegen der geringen Größe der nozizeptiven Nervenendigungen ($<1 \mu\text{m}$) sind Untersuchungen zur
25 Aufklärung dieser Signalwege an den Nozizeptoren in vivo oder im isolierten Gewebe in vitro nicht möglich. Als zelluläres Model des Nozizeptors werden daher Primärkulturen von dissoziierten Neuronen aus dem Spinalganglion verwendet, die modernen zellphysiologischen Untersuchungsmethoden gut zugänglich sind und die in vielen Aspekten funktionell den Nozizeptoren in situ ähneln. Mit diesem Model ist es möglich, die Funktion von Membranrezeptoren und Ionenkanälen im Detail zu untersuchen, die für die Entstehung von
30 Schmerzen wichtig sind. Ohne genauere Kenntnisse dieser Prozesse ist das gerichtete Auf-

finden von Wirkstoffen, die in diese Prozesse eingreifen und als Schmerzmittel verwendet werden könnten, nicht möglich.

In der Drosophilafliege sind Ionenanäle bekannt, die an der Entstehung des Sensorpotentials (transientes Rezeptorpotential) in der Retina beteiligt sind, und die deshalb als TRP-Kanäle bezeichnet werden (Hofmann et al. 2000; Harteneck et al. 2000). In nicht-erregbaren Zellen werden TRP-Kanäle durch ein unbekanntes Link bei Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher geöffnet, um die Speicher wieder zu füllen (zur Übersicht s. Harteneck et al. 2000). Außerdem führt die Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolmyristatacetat oder Oleylacylglycerol zur Öffnung von einigen TRP-Kanälen (Hofmann et al. 1999). TRP-Kanäle können in Neuronen heteromerisieren und entwickeln dann neue Eigenschaften. Z.B. wird die Aktivierung dieses neuen Ionenkanals unabhängig von intrazellulären Kalziumspeicher (Strübing et al. 2001). Ein in der Retina nicht exprimierter Vertreter der TRP-Subfamilie OTRPC, der Vanilloidrezeptor VR-1, ist als multimodaler Kationenkanal bei der Transduktion von Hitzeereizen und der Entstehung von protonenaktivierten Membranströmen für die Nozizeption von Bedeutung (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998; WO 00/32766). In der WO 00/04929 ist die Verwendung von antisense-Oligonukleotiden oder Inhibitoren vorgeschlagen worden, um die Expression von TRP-Protein bzw. deren Funktionalität zu reduzieren und so bestimmte entzündliche Prozesse, insbesondere Asthma, günstig zu beeinflussen.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass TRP-Kanäle das funktionelle Korrelat für die durch Entzündungsmediatoren hervorgerufenen Kalziumantworten in sensorischen Neuronen sind. Die vorliegende Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis der funktionellen Bedeutung von TRP-Kanälen in der Entstehung von Schmerz, insbesondere Entzündungsschmerz und /oder -hyperalgesie. Die Aktivierung von TRP-Kanälen stellt ein "common link" dar, über das möglicherweise alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die den Phospholipase C/Proteinkinase C Signalweg aktivieren, einen Kalziumeinstrom in Nozizeptoren induzieren können. Derartige Kalziumanstiege führen zur Sensibilisierung von Nozizeptoren für Temperaturanstiege und damit zur Hitzehyperalgesie (Guenther et al 1999, Kress & Guenther 1999). Diesen Signalweg können damit solche Entzündungsmediatoren nutzen, um eine Nozizeptorerregung oder -sensibilisierung hervorzurufen. Somit stellen

TRP-Kanäle ein neues Target für potentiell analgetisch wirksame Substanzen dar. Solche Substanzen verhindern vor allem die Entstehung von Entzündungsschmerz und –hyperalgesie. Da auch im Randbezirk von Tumoren häufig Entzündungsmediatoren in hohen Konzentration gefunden werden, stellen sie ein neues therapeutisches Prinzip bei Tumorschmerzen und –hyperalgesie dar.

Die vorliegende Erfindung stellt somit eine neue Klasse von Schmerzmitteln bereit. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Inhibitoren für Ionenkanäle der TRP-Familie zur Behandlung von Schmerzzuständen, insbesondere von

Schmerzzuständen, die durch entzündliche Prozesse hervorgerufen werden. Insbesondere können solche Inhibitoren bei Schmerzzuständen angewendet werden, die durch Nozizeptoren vermittelt werden. Der Schmerzzustand kann dabei durch einen noxischen Reiz oder einen Entzündungsmediator induziert werden. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verhinderung oder Verringerung des Entstehens der Hyperalgesie, insbesondere der Hitzehyperalgesie, durch TRP-Inhibitoren.

Bevorzugt inhibiert der Inhibitor die Aktivität von TRP-Kanalproteinen der Subfamilie STRPC („Short“ TRP, Einteilung siehe Harteneck et al., 2000). Insbesondere gehören zu dieser Familie die folgenden humanen Kanalproteine: TRP-1 (NCBI GenBank Accession No. NM 003304; Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995; Zitt et al., 1996), TRP-1A (GenBank Accession No. Z 73903; Zitt et al., 1996); TRP-2, TRP-3 (GenBank Accession No. U 47050, Zhu et al., 1996); TRP-4 (GenBank Accession No. NM 016179; Zhu et al., 1996; Philipp et al., 2000; McCay et al., 2000), TRP-5 (GenBank Accession No. AF 054568; Sossy-Alaoui et al., 1999), TRP-6 (GenBank Accession No. NM 004621; D’Esposito et al., 1996), oder TRP-7 (WO 00/29571). Inhibitoren für diese Ionenkanäle hemmen den Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum in sensorische Neuronen, der durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptorsysteme und auch durch direkte Aktivierung des Proteinkinase C Signalwegs durch Phorbolmyristatacetat oder Oleylacylglycerol aktiviert wird. Besonders bevorzugt sind dabei TRP-1, TRP-3, TRP-4, und TRP-6.

Dem Fachmann ist bekannt, wie er solche Inhibitoren auffinden kann. Entsprechende Methoden sind beispielsweise in der WO 98/08979 und der WO 00/04929 beschrieben. So

können geeignete Wirtszellen, beispielsweise COS-Zellen, mit Expressionsvektoren transfiziert werden, die für einen der genannten TRP-Kanäle kodieren, beispielsweise gleichzeitig mit einem Expressionsvektor, der für den muscarinen Rezeptor M5 kodiert. Die Funktion der Rezeptoren in den transfizierten Zellen kann dann über die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach der FURA2-Methode oder des Membranpotentials mit patch-clamp-Techniken in An- bzw. Abwesenheit von Testsubstanzen, die potentielle Inhibitoren sein könnten, bestimmt werden. Dabei kann, wenn die Zelle einen muscarinen Rezeptor exprimiert, beispielsweise Muscarin als Stimulus für den Kalziumeinstrom in die Zelle benutzt werden. Solche Untersuchungen können im Hochdurchsatz-Musterungs-Format (High Throughput Screening, HTS) an grossen Substanzbibliotheken ausgeführt werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung deshalb ein Verfahren zum Auffinden eines Wirkstoffes gegen Schmerz, dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) eine Zelle oder Zelllinie bereitgestellt wird, die ein Ionenkanalprotein der TRP-Familie exprimiert;
- (b) eine Testsubstanz in Kontakt mit der Zelle oder Zelllinie gebracht wird;
- (c) der durch einen Stimulus induzierte Kalziumeinstrom in die Zelle oder Zelllinie in Anwesenheit der Testsubstanz gemessen wird; und
- (d) der gemessene Wert mit einem Referenzwert ohne Testsubstanz verglichen und dadurch bestimmt wird, ob die Substanz ein Inhibitor für das Ionenkanalprotein ist.

Vorzugsweise wird in einem solchen Verfahren der Kalziumeinstrom durch die zeitabhängige Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration bestimmt.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Inhibitors eines Ionenkanalproteins der TRP-Familie zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Schmerzzuständen, insbesondere Entzündungsschmerzen.

Formulierung, Dosierung und Anwendung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung richten sich dabei nach der chemischen Natur des Inhibitors, der Art der Erkrankung sowie dem Zustand des Patienten.

Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, wie er erfindungsgemässe Wirkstoffe für bestimmte Anwendungsweisen formulieren kann (Gennaro, Alfonso R. Remington's Pharmaceutical Sciences. Easton Mack 1990. XVI). Dem Fachmann sind ebenfalls Verfahren bekannt, wie er die optimale Dosierung eines Wirkstoffs für eine bestimmte Erkrankung bestimmen kann.

Die Verbindungen können oral, parenteral oder topisch verabreicht werden. Der gewünschte therapeutische Dosis ist von der Indikation und Darreichungsform abhängig und kann experimentell bestimmt werden. Geeignete Anwendungsformen sind beispielsweise Tabletten, Kapseln, Zäpfchen, Lösungen, Säfte, Emulsionen, Aerosole oder dispersible Pulver. Entsprechende Tabletten können beispielsweise durch Mischen des oder der Wirkstoffe mit bekannten Hilfsstoffen, beispielsweise inerten Verdünnungsmitteln, wie Kalziumcarbonat, Kalziumphosphat oder Milchzucker, Sprengmitteln, wie Maisstärke oder Alginsäure, Bindemitteln, wie Stärke oder Gelatine, Schmiermitteln, wie Magnesiumstearat oder Talk, und/oder Mitteln zur Erzielung des Depoteffektes, wie Carboxypolymethylen, Carboxymethylcellulose, Celluloseacetatphthalat, oder Polyvinylacetat erhalten werden. Die Tabletten können auch aus mehreren Schichten bestehen.

Entsprechend können Dragees durch Überziehen von analog den Tabletten hergestellten Kernen mit üblicherweise in Drageehüllen verwendeten Mitteln, beispielsweise Kollidon oder Schellack, Gummi arabicum, Talk, Titandioxid oder Zucker, hergestellt werden. Zur Erzielung eines Depoteffektes oder zur Vermeidung von Inkompatibilitäten kann der Kern auch aus mehreren Schichten bestehen. Desgleichen kann auch die Drageehülle zur Erzielung eines Depoteffektes aus mehreren Schichten bestehen, wobei die oben bei den Tabletten erwähnten Hilfsstoffe verwendet werden können.

Säfte der erfindungsgemässen Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen können zusätzlich noch ein Süßungsmittel, wie Saccharin, Cyclamat, Glycerin oder Zucker sowie ein geschmacksverbesserndes Mittel, z.B. Aromastoffe, wie Vanillin oder Orangenextrakt, enthalten. Sie können ausserdem Suspendierhilfsstoffe oder Dickungsmittel, wie Natriumcar-

boxymethylcellulose, Netzmittel, beispielweise Kondensationsprodukte von Fettalkoholen mit Ethylenoxid, oder Schutzstoffe, wie p-Hydroxybenzoate, enthalten.

Injektionslösungen werden in üblicher Weise, z.B. unter Zusatz von Konservierungsmitteln, wie p-Hydroxybenzoaten, oder Stabilisatoren, wie Alkalisalzen der Ethylendiamintetraessigsäure, hergestellt und in Injektionsflaschen oder Ampullen abgefüllt.

Die eine oder mehrere Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen enthaltenden Kapseln können beispielsweise hergestellt werden, indem man die Wirkstoffe mit inerten Trägern, wie Milchzucker oder Sorbit, mischt und in Gelatinekapseln einkapselt.

Geeignete Zäpfchen lassen sich beispielsweise durch Vermischen mit dafür vorgesehenen Trägemitteln, wie Neutralfetten oder Polyethylenglykol bzw. dessen Derivaten herstellen.

Die Verbindungen können sowohl enteral als auch parenteral verabreicht werden. Als Dosis für die orale Anwendung werden 0,1 bis 500 mg Wirkstoff pro Dosis, für die i.v.-Anwendung von 0,05 bis 150 mg pro Dosis vorgeschlagen. Der gewünschte therapeutische Dosis ist von der Indikation und Darreichungsform abhängig und kann experimentell bestimmt werden.

Die Arzneimittel sind für orale oder parenterale, gegebenenfalls auch topische Verabreichung geeignet. Als Arzneimittelformen dienen vorwiegend Tabletten, Dragees, Ampullen und Saftzubereitungen. Die Einzeldosis zu diesen Arzneimittelformen beträgt zwischen 1,0 und 200 mg, vorzugsweise 20 und 50 mg pro 75 kg Körpergewicht. Je nach der Schwere des Falles sind täglich im allgemeinen 1 bis 3 Einzeldosen zu verabreichen.

Ein TRP-Inhibitor ist beispielsweise die Substanz (R,S)-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxyisochinolin-1-yl)-2-cyclohexyl-N-(3,3-diphenylpropyl)-acetamid- hydrochloride (BIIA 388 CL; Krishtal et al., 2001), die gemäss EP 0 957 092 hergestellt und formuliert werden kann. Diese Substanz wurde ursprünglich als Blocker bestimmter sogenannter „store operated“ Kationenkanäle in bestimmten elektrisch nicht erregbaren Zellen (RBL-Zellen) beschrieben, die nicht im Zentralnervensystem vorkommen.

Von der Entwicklung eines solchen Präparats würden alle Patienten profitieren, deren Erkrankung zur plastischen Veränderung von Nozizeptoren im peripheren Nervensystem führt und erst sekundär Lernprozesse des ZNS anschaltet, die die Chronifizierung der Schmerzen weiterführen. Vor allem bei Rheumatischen Erkrankungen, z.B. Chronischer Rheumatoider Polyarthritiden, bedeutet die Entwicklung von potenten peripher wirksamen Analgetika einen großen Fortschritt. Aber auch Schmerzen als Folge anderer Erkrankungen mit entzündlicher Beteiligung können dadurch wesentlich gebessert werden, z.B. Migräne, entzündliche Arthritiden und Tumorschmerzen.

Literatur

D'Esposito M, Strazzullo M, Cuccurese M, Spalluto C, Rocchi M, D'Urso M and Ciccodicola A. Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21-->q22. Cytogenet. Cell Genet. 83 (1-2), 46-47 (1998)

Dittert I, Vlachová V, Knotková H, Vitaskova Z, Vyklicky L, Kress M, Reeh PW (1998) A technique for fast application of heated solutions of different composition in cultured neurons. J Neurosci Meth 82:195-201.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260:3440-3450.

Guenther S, Reeh PW, Kress M (1999) Rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. Eur J Neurosci 11:3143-3150.

Harteneck C, Plant TD, Schultz G (2000) From worm to man: three subfamilies of TRP channels. Trends Neurosci 23:159-166.

Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Hartenek C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 und TRPC3 channels by diacylglycerol. Nature 397:259-263.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med* 78:14-25.

Jiang T, Danilo P, Steinberg SF (1998) The thrombin receptor elevates intracellular calcium in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30:2193-2199.

Koltzenburg M, Kress M, Reeh PW (1992) The Nociceptor Sensitization by Bradykinin Does Not Depend on Sympathetic Neurons. *Neurosci* 46:465-473.

Kress M, Guenther S (1999) The role of $[Ca^{2+}]_i$ in the ATP-induced heat sensitization process of rat nociceptive neurons. *J Neurophysiol* 81:2612-2619.

Kress M, Reeh PW (1996) Chemical excitation and sensitization in nociceptors. In: *Neurobiology of Nociceptors* (Cervero F, Belmonte C eds), pp 258-297. New York: Oxford University Press Inc.

Kristhtal O, Kirichok Y, Tsintsadze T, Lozovaya N, Loesel W, Arndts (2001) New channel blocker BIIA388CL blocks delayed rectifier, but not A-type potassium current in central neurons. *Neuropharmacology* 40: 233-241.

McKay RR, Szymeczek-Seay CL, Lievreumont JP, Bird GS, Zitt C, Jungling E, Luckhoff A and Putney Jr JW. Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRP4 and TRP3. *Biochem. J.* 351 Pt 3, 735-746 (2000)

Philipp S, Trost C, Warnat J, Rautmann J, Himmerkus N, Schroth G, Kretz O, Nastainczyk W, Cavalie A, Hoth M and Flockerzi V. TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca^{2+} -like channels in adrenal cells. *J. Biol. Chem.* 275 (31), 23965-23972 (2000)

Reiser G, Hamprecht B (1985) Bradykinin causes a transient rise of intracellular Ca^{2+} -activity in cultured neural cells. *Pflüger's Archiv* 405:260-264.

- Sossey-Alaoui, K., Lyon, J.A., Jones, L., Abidi, F.E., Hartung, A.J., Hane, B., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E. and Srivastava, A.K. Molecular cloning and characterization of TRPC5 (HTRP5), the human homologue of a mouse brain receptor-activated capacitative Ca(2+) entry channel. *Genomics* 60 (3), 330-340 (1999)
- Stefanini M, DeMartino C, Zamboni L (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216:173-174.
- Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6:151-158.
- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. (2001) Trpc1 and trpc5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*. 29:645-55.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann B, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.
- Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G. and Montell, C. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (21), 9652-9656 (1995)
- Zhu X, Chu PB, Peyton M and Birnbaumer L. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett.* 373 (3), 193-198 (1995)
- Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E and Birnbaumer L. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 85 (5), 661-671 (1996)

Zitt,C., Zobel,A., Obukhov,A.G., Harteneck,C., Kalkbrenner,F., Luckhoff,A. and Schultz,G.
Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} -permeable cation channel activated by
calcium store depletion. Neuron 16 (6), 1189-1196 (1996)

5 Beispiele

Methoden:

Neuronenprimärkultur

10 Die lumbalen Spinalganglien der Ratte wurden nach Entfernung der lumbalen Wirbelsäule
und sagittaler Eröffnung des Wirbelkanals entfernt, gereinigt und mit Collagenase (0.28
U/ml in D-MEM, 75 min, Boehringer Mannheim) und Trypsin behandelt (25.000 U/ml in
Phosphatpuffer, 12 min, Sigma, Diesenhofen). Nach dem Waschen der Ganglien in Dulbec-
15 co's modified eagle medium (D-MEM, Gibco, Karlsruhe) erfolgte die mechanische Triturie-
rung mittels einer partiell zugeschmolzenen Pasteurpipette. Die vereinzelt Spinalgang-
lien neurone wurden mit Kulturmedium (s.u.) gewaschen, zentrifugiert und auf sterile Kul-
turschälchen mit Glasboden und Poly-L-lysin-Beschichtung ausplattiert. Dem synthetischen
Kulturmedium TNB 100 (mit Supplement, Biochrom, Berlin) wurden 100 ng/ml Nerven-
20 wachstumsfaktor (NGF 7S, Alomone, Israel), Penicillin/Streptomycin (je 20.000 I.U./100 ml)
und 2 mM L-Glutamin (beides von Gibco Life Technologies) zugesetzt. Die gewonnenen
Primärkulturen waren nach 2 Stunden adhären und wurden für maximal 36 Stunden unter
sterilen Bedingungen bei 37 °C und wasserdampfgesättigter, 5%-iger CO_2 -Atmosphäre in-
kubiert.

Kalziummikrofluorimetrie

25 Zur funktionellen Untersuchung wurden die Neurone nicht-disruptiv mit dem membrangän-
gigen Kalziumindikatorfarbstoff FURA-2/AM (3 μM , Molecular Probes, Leiden, Nieder-
30 lande) beladen, und der Farbstoff für 30 min mit externer Lösung (ECS) ausgewaschen. Die
ECS bestand aus (in mM) 145 NaCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES und 10 Glucose, pH 7,4
mit NaOH eingestellt. Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte ra-

tiometrisch. Dazu wurden Hintergrund-korrigierte Fluoreszenzbilder mittels eines Slow Scan CCD-Kamera-Systems mit einem - in ein Axiovert Mikroskop mit 40-fach Fluotar-Ölimmersions-Objektiv (Zeiss, Jena, Germany) eingekoppelten - schnellem Monochromator (PTI, New Jersey) wurde aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda > 420$ nm mit einer
5 Frequenz von 1 Hz bei gleicher Anregungsdauer je Wellenlänge (340 und 380 nm je 200 ms) aufgenommen. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ wurde berechnet (Grynkiewicz et al. 1985) und als Kalibrationskonstanten in vitro wurden bestimmt: $R_{min} = 0.44$, $R_{max} = 8.0$ and $K_{eff} = 1.2 \mu M$.

10 Zur Stimulation der Neurone wurde ein 7-Kanal-Applikationssystem mit Magnetventilen verwendet, das einen schnellen Lösungswechsel an der Zelle ($\tau = 100$ ms) erlaubte (Dittert et al. 1998). Alle Substanzen zur Stimulation der Neurone wurden in ECS gelöst und mittels Schwerkraft appliziert. Zur Stimulation wurden benutzt: $10 \mu M$ Bradykinin, $1 \mu M$ Muscarin, $1 \mu M$ Phorbol-Myristat-Acetat, bzw. $1 \mu M$ Trypsin. Eine Reihe von Ableitungen wurden
15 in Kalziumfreier ECS durchgeführt, in der $CaCl_2$ durch 10 mM EGTA ersetzt wurde. Alle Salze und Chemikalien außer den gesondert genannten wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen. Die Substanzen BILA388CL und BILA908MS wurden uns von der Firma Boehringer Ingelheim überlassen.

20 *Fixierungsmethoden und Immunzytochemie:*

Der immunhistochemische Nachweis der Kanalproteine erfolgte durch indirekte Immunhistochemie an Kryostatschnitten oder kultivierten Neuronen mittels Fluoreszenzmarkierung. Zur Gewinnung von Ganglienschnitten wurden fünf junge erwachsene Wistar Ratten
25 durch eine Überdosis Chloroform getötet und die Ganglien entnommen. Anschliessend wurde die Ganglien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an einem Kryostaten (Jung Frigocut 1900 E, Leica, Bensheim) Schnitte einer Dicke von $10 \mu m$ angefertigt. Die Schnitte und die auf Glasobjektträgern kultivierten Neurone wurden je nach verwendetem Material entweder 15 min mit Zambonifixativ (Stefanini et al. 1967), oder 10 min mit Ace-
30 ton ($-20^\circ C$) fixiert.

Nach dem Auswaschen des Fixativs mit 0.1 M Phosphatpuffer folgte die Blockung unspezifischer Bindungsstellen (PBS-Puffer, 10 % normales Schweineserum, 0.1 % bovines Serumalbumin und 0.5 % Tween 20). Die Schnitte/Zellen wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit Antiseren gegen TRP-Kanäle (TRP-1, TRP-3, TRP-6, Alomone Lab., Tel Aviv, Israel; TRP-4 Prof. Flockerzi, Universität des Saarlandes) und biotinyliertem Isolectin B4 (IB4, Sigma) bzw. Antiseren gegen den Vanilloirezeptor 1 (VR1, Neuromics) inkubiert (TRP/IB4, TRP/VR1). Nach Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit den sekundären Reagentien. Die TRP-Antiseren wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem anti-Kaninchen IgG aus der Ziege, das biotinylierte Isolectin B4 mit Cy-3 konjugiertem Streptavidin, und das VR1-Antiserum mit Cy-3 konjugiertem anti-Meerschweinchen IgG inkubiert. Nach weiterem Waschen in PBS erfolgte die Einbettung von Schnitten und Zellen in gepuffertem Glycerol pH 8,6. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde an einem Epifluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60F, Hamburg) unter Verwendung geeigneter Filter (Cy3, Anregungsfilter 525-560 nm, Sperrfilter 570-650 nm und FITC Anregungsfilter 460-490 nm, Sperrfilter 515-550 nm) ausgewertet. Vier Schnitte pro Tier mit einem Mindestabstand von 50 µm bzw. 3 Glaträger mit Zellkulturen wurden für jeden TRP-Kanal von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt.

Kontrollschnitte, die mit einem präabsorbierten Antiserum (20-100 µg Antigen/ml verdünntes Antiserum) inkubiert wurden zeigten keine Immunreaktion. Zur computergestützten Bildanalyse wurden für jeden TRP-Subtyp mindestens zwei Schnitte aus einem Ganglion (Mindestabstand 50 µm) verwendet (ScionImage, Scion, Las Vegas, NV). Es wurden nur Zellen mit deutlich sichtbarem Zellkern aufgenommen und zur Messung verwendet.

Nachweis der mRNA-Expression mit der RT-PCR:

Der Nachweis von TRPs auf mRNA-Ebene erfolgte mittels der RT-PCR. Dafür wurden die lumbalen Spinalganglien und das Gehirn (Positivkontrolle) aus 5 Ratten isoliert, in RNazol (WAK-Chemie, Bad-Homburg, Germany) schnellgefroren und mit dem Ultraturrax homogenisiert. Die Gesamt-RNA wurde mit der RNazol-Reagenz Technik nach dem Protokoll des Herstellers präpariert.

Mögliche Kontamination durch DNA wurde mit DNase (1 U/ μ g total RNA, Gibco-BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) in 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl für 15 min at 25 °C entfernt. Gleiche Mengen von RNA wurden revers transkribiert. Ansatz: 3 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 10 mM Dithiothreitol, 0.5 mM dNTPs (Gibco-BRL) und 25 μ g oligo(dT) (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) mit 200 U Superscript RNase H⁻ Reverse-Transcriptase (Gibco-BRL) für 50 min bei 42 °C. Für die PCR Reaktion wurden 4 μ l Puffer II, 4 μ l MgCl₂, 1 μ l dNTP (je 10 mM), 0.4 μ l (2 U) AmpliTaq Gold Polymerase (alle von Perkin Elmer) und 1 μ l von jedem Primer (20 μ M) gemischt

Tabelle 1: Verwendete Primer

	Produktgröße	NCBI GenBank Acc. No.	Positionen der Primer
Trp1	196bp	AF061266	rev.1465bp, for.1269bp
trp2neu	117	AF136401	rev.2019, for.1902
trp3	187	AF061875	rev.121 for.17
trp4neu a	104	AB008889	rev.1722, for.1535
trp4alph	173	AF288408	rev.2620, for.4447
beta	152	AF288407	
alpha/beta	404		a/brev.2245, a/bfor.2646
trp5	94	AF061876	rev.102, for. 8
trp6	126	AF657748	rev.195, for.70
trp7	200	AF139923	rev.1415, for.1215

Für die PCR wurde 10 min bei 95 °C, 30 Zyklen von 45 s bei 94 °C, 60 s bei 58 °C und 45 s bei 73 °C und im Anschluß für 7 min bei 73 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne vorausgehende RT-Reaktion verwendet und das jeweilige Template durch Wasser ersetzt. Unter diesen Bedingungen wurde keine Amplifizierung nachgewiesen.

Ergebnisse:

Die Stimulation mit Bradykinin, Prostaglandin E₂, Muscarin oder Trypsin verursachten in kultivierten DRG-Neuronen einen Kalziumanstieg von etwa 100 bis 300 nM. Die 4 Substanzen zeigten eine unterschiedliche Tachyphylaxie: der durch Bradykinin verursachte Kalziumanstieg zeigte in Kontrolllösungen eine deutliche Tachyphylaxie, während die Neurone auf wiederholte Gabe alle anderen Mediatoren mit etwa gleich großen Kalziumanstiegen antworteten. Als Ursache der Tachyphylaxie wird eine Inaktivierung durch Internalisierung von Bradykininrezeptoren vermutet. Da für jede der Substanzen Membranrezeptoren bekannt sind, die durch Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und die Entstehung von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) Kalzium aus intrazellulären Speichern freisetzen, wurde in einigen Experimenten kalziumfreie ECS verwendet. Unter diesen Bedingungen rief keine der Substanzen einen signifikanten Kalziumanstieg hervor, die Anstiege scheinen daher durch einen Kalziumeinstrom von außen in die Zelle verursacht zu werden. Der Kalziumeinstrom kann einerseits durch die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, andererseits durch Liganden-gesteuerte Kationenkanäle erfolgen. Daher wurden in einigen Muskarin-Experimenten die spannungsabhängigen Kalziumkanäle durch Zugabe von 200 µM Cd²⁺/Co²⁺ blockiert. Unter dieser Bedingung waren die durch Muskarin verursachten Antworten nur wenig vermindert, was auf eine Aktivierung von Liganden-gesteuerten Kationenkanälen schließen lässt.

Da für IP₃ außer der Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern keine weitere Wirkung bekannt ist, haben wir den zweiten Second messenger in diesem System genauer untersucht. DAG aktiviert das Enzym Proteinkinase C (PKC) und scheint direkt Kationenkanäle zu öffnen (Hofmann et al. 1999). Deshalb wurden die Zellen durch extrazelluläre Zugabe von Phorbol-Myristat-Acetat (PMA), einem membrangängigen Aktivators der PKC, stimuliert. PMA sowie Oleyl-Acylglycerol (OAG), ein membrangängiges DAG-Analogon riefen einen Kalziumeinstrom an DRG-Neuronen hervor, der in Kalziumfreier ECS ausblieb. Dies läßt auf die Aktivierung eines – durch DAG und/oder PKC aktivierten – Kationenkanal schließen.

Die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher durch Vorbehandlung mit Thapsigargin (1 µM) beeinflusste die durch PMA hervorgerufene Antwort nicht. Demnach ist die Akti-

5 vierung des durch PMA aktivierten Kalziumeinstroms nicht von der Entleerung intrazellulärer Speicher abhängig. Der am Kalziumeinstrom beteiligte Kationenkanal wird möglicherweise direkt über die PKC abhängige Phosphorylierung eines Kanalproteins aktiviert. Von Schultz und Mitarbeitern wurde ein solcher Aktivierungsmechanismus für einige Mitglieder
10 der TRP-Kanalfamilie beschrieben (Hofmann et al. 1999). Für die meisten der bekannten TRP-Kanäle sind die molekularen Aktivierungsmechanismen bisher nicht aufgeklärt. Auch OAG/DAG können die PKC aktivieren, so daß die Phosphorylierung des Kanalproteins durch das Enzym als Aktivierungsmechanismus nicht ausgeschlossen ist. Deshalb wurden einige Neurone mit PMA in Anwesenheit des PKC-Inhibitors Staurosporin (0.25 µM) sti-
15 muliert. Unter diesen Bedingungen blieb die Antwort auf PMA-Stimulation aus. Dies läßt auf die Beteiligung der PKC an der Kanalaktivierung schließen.

Im Gegensatz zu diesen Befunden war die Antwort auf Muskarin nach Vorbehandlung mit Thapsigargin deutlich reduziert. Möglicherweise ist dieser Unterschied auf die Expression
15 und differentielle Aktivierung mehrerer TRP-Kanal-Subtypen in sensorischen Neuronen zurückzuführen.

Um die Beteiligung von TRP-Kanälen an dem o.g. Kalziumeinstrom weiter untersuchen zu können, wurde die Substanz BIIA388CL verwendet, die als Inhibitor von TRP-Kanälen
20 wirkt. BIIA388CL (1 µM) verursachte in einigen Fällen bei der ersten Applikation selbst einen Kalziumanstieg. Gleichzeitig verhinderte die Substanz aber die PMA- bzw. die OAG-Antwort vollständig. Ebenso wirksam war der kommerziell erhältliche TRP-Inhibitor SKF 96365 (1-(beta-[3-(4-Methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl)-1H-imidazol-
Hydrochlorid, CAS 130495-35-1, Merritt, J.E., et al., Biochem. J., 271, 515 (1990); 1 µM,
25 Sigma, Deisenhofen). Auch die Antworten auf Trypsin wurden durch SKF 96365 oder durch BIIA388CL inhibiert.

Diese Befunde, die bereits stark für eine Beteiligung von TRP-Kanälen and der exzitatorischen und sensibilisierenden Wirkung einiger schmerzrelevanter Mediatoren sprechen, wur-
30 den auf mRNA-Ebene weiter erhärtet. Nach Isolierung und Amplifizierung der mRNA/cDNA aus Spinalganglien, wurde die Identität mehrerer TRP-Kanäle durch Sequenzierung der amplifizierten Produkte bestätigt. In Spinalganglien (DRG) wurde mRNA für

TRP-1 (7/7 DRGs), TRP-3 (7/7 DRGs), TRP-4 (7/7 DRGs) und TRP-6 (6/7 DRGs) nachgewiesen. mRNA für TRP-2, TRP-5 und TRP-7 wurden nur in Einzelfällen gefunden (s. Tabelle 2).

Tabelle 2:

TRP	1	2	3	4	5	6	7
DRG	X	X	X	X	X	X	-
2	X	-	(X)	X	-	X	-
3	X	-	X	X	-	X	-
4	X	-	X	X	X	-	-
5	X	X	X	X	?	X	-
6	X	X	X	X	?	X	X
7	x	-	X	x	?	X	-

Auf Proteinebene wurden diese Ergebnisse weiter untermauert. Mittels Immunhistochemie konnte TRP-1-Immunreaktivität (IR) in den Perikaryen großer Neuronen (Aß-Faserneurone), TRP-3-IR in VR1- und IB₄-positiven (C, Ad-Faser-) Neuronen sowohl in vitro unter Kulturbedingungen als auch in situ in Schnitten von Spinalganglien nachgewiesen werden. Die Lokalisation des TRP-4 und TRP-6 Kanalproteins in Spinalganglien ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Pharmazeutische Anwendungsbeispiele

a) Dragees

1 Drageekern enthält:

Wirkstoff gemäss Erfindung 30,0 mg

Milchzucker 100,0 mg

Maisstärke 75,0 mg

Gelatine 3,0 mg

Magnesiumstearat 2,0 mg

210,0 mg

Herstellung:

Die Mischung der Wirksubstanz mit Milchzucker und Maisstärke wird mit einer 10%-igen wässrigen Gelatinelösung durch ein Sieb mit 1 mm Maschenweite granuliert, bei 40 DEG C getrocknet und nochmals durch ein Sieb gerieben. Das so erhaltene Granulat wird mit Magnesiumstearat gemischt und verpresst. Die so erhaltenen Kerne werden in üblicher Weise mit einer Hülle überzogen, die mit Hilfe einer wässrigen Suspension von Zucker, Titan-
dioxid, Talkum und Gummi arabicum aufgebracht wird. Die fertigen Dragees werden mit Bienenwachs poliert.

b) Tabletten

Wirkstoff gemäss Erfindung 30,0 mg

Milchzucker 100,0 mg

Maisstärke 70,0 mg

löslich Stärke 7,0 mg

Magnesiumstearat 3,0 mg

210,0 mg

Herstellung

Wirkstoff und Magnesiumstearat werden mit einer wässrigen Lösung der löslichen Stärke granuliert, das Granulat getrocknet und innig mit Milchzucker und Maisstärke vermischt. Das Gemisch wird sodann zu Tabletten von 210 mg Gewicht verpresst.

c) Kapseln

Wirkstoff gemäss Erfindung 20,0 mg

Milchzucker 230,0 mg

Maisstärke 40,0 mg

Talk 10,0 mg

300,0 mg

Herstellung

Wirkstoff, Milchzucker und Maisstärke werden zunächst in einem Mischer und dann in ei-

ner Zerkleinerungsmaschine vermengt. Das Gemisch wird nochmals in den Mischer gegeben, gründlich mit dem Talk vermengt und maschinell in Hartgelatine kapseln abgefüllt.

d) Tabletten

- 5 Wirkstoff gemäss Erfindung 40,0 mg
Milchzucker 100,0 mg
Maisstärke 50,0 mg
kolloidale Kieselsäure 2,0 mg
Magnesiumstearat 3,0 mg
10 insgesamt 200,0 mg

Herstellung:

- Der Wirkstoff wird mit einem Teil der Hilfsstoffe gemischt und mit einer Lösung der löslichen Stärke in Wasser granuliert. Nach dem Trocknen des Granulats wird der Rest der
15 Hilfsstoffe zugemischt und die Mischung zu Tabletten verpresst.

e) Dragées

- Wirkstoff gemäss Erfindung 20,0 mg
Milchzucker 100,0 mg
20 Maisstärke 65,0 mg
kolloidale Kieselsäure 2,0 mg
lösliche Stärke 5,0 mg
Magnesiumstearat 3,0 mg
insgesamt 195,0 mg

25

Herstellung:

Der Wirkstoff und die Hilfsstoffe werden, wie in Beispiel 1 beschrieben, zu Tablettenkernen verpresst, die mit Zucker, Talcum und Gummi arabicum in üblicher Weise dragiert werden.

30 f) Suppositorien

- Wirkstoff gemäss Erfindung 50,0 mg
Milchzucker 250,0 mg

Suppositorienmasse q.s. ad 1,7 g

Herstellung:

Der Wirkstoff und der Milchzucker werden miteinander vermischt und die Mischung in der
5 geschmolzenen Suppositorienmasse gleichmässig suspendiert. Die Suspensionen werden in
gekühlte Formen zu Suppositorien von 1,7 g Gewicht ausgegossen.

g) Ampullen

Wirkstoff gemäss Erfindung 20,0 mg

10 Natriumchlorid 5,0 mg

Bi-destilliertes Wasser q.s. ad 2,0 ml

Herstellung:

Der Wirkstoff und das Natriumchlorid werden in bi-destilliertem Wasser gelöst und die Lö-
15 sung in Ampullen steril abgefüllt.

h) Ampullen

Wirkstoff gemäss Erfindung 10,0 mg

Natriumchlorid 7,0 mg

20 Bi-destilliertes Wasser q.s. ad 1,0 mg

i) Tropfen

Wirkstoff gemäss Erfindung 0,70 g

p-Hydroxybenzoesäuremethylester 0,07 g

25 p-Hydroxybenzoesäurepropylester 0,03 g

Entmineralisiertes Wasser q.s. ad 100,00 ml

Herstellung:

Der Wirkstoff und die Konservierungsmittel werden in entmineralisiertem Wasser gelöst, die
30 Lösung filtriert und in Flaschen zu je 100 ml abgefüllt.

Ansprüche

1. Verwendung eines Inhibitors eines Ionenkanalproteins der TRP-Familie zur Behandlung eines Schmerzzustandes.
- 5 2. Verwendung eines Inhibitors eines Ionenkanalproteins der TRP-Familie zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung eines Schmerzzustandes.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Schmerzzu-
10 stand durch einen entzündlichen Prozess verursacht wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Schmerzzustand durch einen noxischen Reiz oder einen Entzündungsmediator induziert wird.
- 15 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Schmerzzustand durch Nozizeptoren vermittelt wird.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Schmerzen eine Folge einer rheumatischen Erkrankung, z.B. chronischer rheumatoider
20 Polyarthrititis, oder die Folge von Migräne, entzündlicher Arthritis, oder eines Tumors ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verringerung der Hyperalgesie.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Io-
25 nenkanalprotein zur STRPC-Subfamilie der TRP-Rezeptoren gehört.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Ionenkanalprotein TRP-1, TRP1A, TRP-2, TRP-3, TRP-4, TRP-5, TRP-6, oder TRP-7 ist.
- 30 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Inhibitor den Kalziumeinstrom in sensorische Neuronen hemmt.

11. Verfahren zum Auffinden eines Wirkstoffes gegen Schmerz, dadurch gekennzeichnet, dass

(a) eine Zelle oder Zelllinie bereitgestellt wird, die ein Ionenkanalprotein der TRP-Familie exprimiert;

5 (b) eine Testsubstanz in Kontakt mit der Zelle oder Zelllinie gebracht wird;

(c) der Kalziumstrom durch die Zellmembran in Anwesenheit der Testsubstanz gemessen wird; und

(d) der gemessene Wert mit einem Referenzwert verglichen und dadurch bestimmt wird, ob die Substanz ein Inhibitor für das Ionenkanalprotein ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internati
 Application No
 PCT/EP 02/04086

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K38/17 A61P25/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data, PASCAL, PHARMAPROJECTS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 08979 A (UNIV CALIFORNIA) 5 March 1998 (1998-03-05) *siehe Zusammenfassung, Seite 1, Zeilen 8-17, Seite 22, Zeile 9 bis Seite 23, Absatz 1, Seite 24, Zeilen 11-25*	1-11
Y	WO 00 04929 A (UNIV SOUTH ALABAMA) 3 February 2000 (2000-02-03) cited in the application *siehe Zusammenfassung, Seite 2, Zeile 31 mit Seite 3, Zeilen 1-17, Seite 7 mit Seite 8, Absatz 1*	1-11
A	WO 00 29571 A (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISYA ; SHIMIZU NOBUYOSHI (JP); NAGAMINE KE) 25 May 2000 (2000-05-25) *siehe Zusammenfassung*	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 October 2002

Date of mailing of the international search report

21/10/2002

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stoltner, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. application No

PCT/EP 02/04086

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9808979	A	05-03-1998	US 5932417 A AU 4170597 A WO 9808979 A1	03-08-1999 19-03-1998 05-03-1998
WO 0004929	A	03-02-2000	AU 5229199 A WO 0004929 A1	14-02-2000 03-02-2000
WO 0029571	A	25-05-2000	EP 1048727 A1 WO 0029571 A1	02-11-2000 25-05-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati s Aktenzeichen

PCT/EP 02/04086

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/17 A61P25/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data, PASCAL, PHARMAPROJECTS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 98 08979 A (UNIV CALIFORNIA) 5. März 1998 (1998-03-05) *siehe Zusammenfassung, Seite 1, Zeilen 8-17, Seite 22, Zeile 9 bis Seite 23, Absatz 1, Seite 24, Zeilen 11-25* ---	1-11
Y	WO 00 04929 A (UNIV SOUTH ALABAMA) 3. Februar 2000 (2000-02-03) in der Anmeldung erwähnt *siehe Zusammenfassung, Seite 2, Zeile 31 mit Seite 3, Zeilen 1-17, Seite 7 mit Seite 8, Absatz 1* ---	1-11
A	WO 00 29571 A (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISYA ;SHIMIZU NOBUYOSHI (JP); NAGAMINE KE) 25. Mai 2000 (2000-05-25) *siehe Zusammenfassung* -----	1-11



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Oktober 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/10/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stoltner, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/04086

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. **1-10**
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Ansprüche 1-10 gerichtet auf ein Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschl./tier. Körpers
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internatio

Aktenzeichen

PCT/EP 02/04086

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9808979	A	05-03-1998	US	5932417 A	03-08-1999
			AU	4170597 A	19-03-1998
			WO	9808979 A1	05-03-1998
WO 0004929	A	03-02-2000	AU	5229199 A	14-02-2000
			WO	0004929 A1	03-02-2000
WO 0029571	A	25-05-2000	EP	1048727 A1	02-11-2000
			WO	0029571 A1	25-05-2000

This Page Blank (uspto)